

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1957

THÈSE

776

POUR LE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(MENTION MÉDECINE)

PRÉSENTÉE PAR

Asa Paul RUSKIN

Né le 26 Septembre 1929, à NEW YORK (U. S. A.)
B. A. EMORY UNIVERSITÉ, GEORGIA (U. S. A.)

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} Juillet 1957

**Etude de la répartition
des phospho-dérivés de l'adénosine
dans le cerveau et dans le cervelet
par électrophorèse sur papier
et la spectrophotométrie**

Président : M. le Professeur M.-F. JAYLE

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1957

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1957

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(MENTION MÉDECINE)

PRÉSENTÉE PAR

Asa Paul RUSKIN

Né le 26 Septembre 1929, à NEW-YORK (U. S. A.)

B. A. EMORY UNIVERSITÉ, GEORGIA (U. S. A.)

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} Juillet 1957

Etude de la répartition des phospho-dérivés de l'adénosine dans le cerveau et dans le cervelet par électrophorèse sur papier et la spectrophotométrie

Président : M. le Professeur M.-F. JAYLE



PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1957

DOYEN HONORAIRE :

M. BAUDOUIN.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BAUDOUIN, BÉNARD (H.), BROQ (P.), CADENAT, CARNOT, CHABROL, CHAMPY, CHEVASSU, DEBRÉ (R.), DELBET, DONZELOT, GASTINEL, GUILLAIN, HALPHEN, HARVIER, LAROCHE (G.), LAUBRY, LEMAITRE, LÉVY-SOLAL, LHERMITTE, LIAN, LOEPER, MARION, MATHIEU, MOCQUOT, MONDOR, MULON, OLIVIER (E.), RICHET (Ch.), SANNIÉ, SÉZARY, TANON, VELTER.

Doyen LÉON BINET.
Membre de l'Institut.
Assesseur JEAN VERNE.

I. — PROFESSEURS :

	MM.
Anatomie	CORDIER.
Anatomie pathologique	DELARUE.
Bactériologie	FASQUELLE.
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT.
Biologie médicale	FAUVERT (R.).
Cancérologie médicale et sociale	JEAN-BERNARD.
Chimie médicale	JAYLE (M.-F.).
Cliniques chirurgicales	Hôtel-Dieu MENEGAUX.
	Beaujon SICARD (A.).
	Salpêtrière MOULONGUET.
	Cochin QUÉNU (J.).
Clinique chirurgicale réparatrice et orthopédique	MERLE D'AUBIGNÉ.
Clinique de cardiologie	MOUQUIN (M.).
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire	DE GAUDART- D'ALLAINES.
Clinique chirurgicale infantile et d'orthopédie	FÈVRE (M.).
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire	MONOD.
Clinique de la Tuberculose	BERNARD (E.).
Clinique de Neuro-chirurgie	PETIT-DUTAILLIS.
Clinique de puériculture	LELONG.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	DEGOS.
Clinique des maladies du sang	CHEVALLIER.
Clinique des maladies du système nerveux	ALAJOUANINE.
Clinique des maladies des enfants	CATHALA.
Clinique des maladies infectieuses	MOLLARET.
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale	DELAY.
Clinique gynécologique	FUNCK-BRENTANO.
Cliniques médicales	Hôtel-Dieu BARIÉTY.
	Bichat JUSTIN-BESANÇON.
	Cochin MOREAU.
	Broussais DE GENNES.
Clinique médicale d'hydro-climatologie thérapeutique	DEBRAY.
Clinique médicale propédeutique	PACTEUR VALLERY- RADOT.
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition	
Cliniques obstétricales	Tarnier BOULIN.
	Baudelocque LANTUÉJOUL.
	Port-Royal VARANGOT.
Clinique ophtalmologique	LACOMME.
Clinique oto-rhino-laryngologique	RENARD.
Clinique physio-pathologique des problèmes alimentaires	AUBIN.
Clinique psychiatrique infantile	HAMBURGER.
Clinique Rhumatologique et Sociale	HEUYER.
Clinique stomatologique	COSTE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	DECHAUME.
Clinique thérapeutique médicale	SÈNÈQUE.
	LEMAIRE.

Clinique urologique	MM.
Embryologie	FÉY.
Génétique	GIROUD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAMY.
Histologie	SOULIÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	VERNE.
Hygiène et médecine préventive	TURPIN.
Médecine du travail	JOANNON.
Médecine légale	DESOILLE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	PIÉDELIEVRE.
Pathologie chirurgicale	GALLIARD.
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	LAVIER.
Pathologie humorale et immunologie expérimentale	LENÈGRE.
(Chaire à titre personnel).	
Pathologie médicale	MERKLEN.
Pathologie et thérapeutique générales	DECOURT.
Pédiatrie sociale	GARCIN.
Pharmacologie et matière médicale	MARIE.
Physico-chimie médicale (chaire à titre personnel)	HAZARD.
Physiologie	DOGNON.
Physique médicale	BINET (Léon).
Radiologie médicale	STROHL.
Technique chirurgicale	DESGREZ (Henri).
Thérapeutique	PATEL.
	N...

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES ET AGREGES

	MM.		
Anatomie	DELMAS.	Obstétrique	GRASSET.
	DEBEYRE.		LEPAGE.
	OLIVIER.		MERGER.
	CABROL.		MORIN.
Anatomie patholo- gique	M ^{lle} GAUTHIER- VILLARS.		RAVINA.
	BUSSER.	Ophtalmologie ..	ROBEY (M.).
	GOUYGOU.		LE LORIER.
Bactériologie	NEVOT.	Orthopédie	DESIGNES.
	CHRISTOL (D.).		BREGEAT.
	ETTORI.	Oto-rhino-laryng. }	JUDET.
Biochimie médic. }	N...		AUBRY.
	N...		MADURO.
Biologie médic. .	BOURLIÈRE.	Parasitologie }	CHABAUD.
Dermato-Syphi- ligraphie	DUPERRAT.		N...
Embryologie	TUCHMANN.		ABOULKER.
	N...		BAUMANN.
Histologie	N...		GOSSET.
	N...		LAURENCE.
Hydrologie	CORNET.		LORTAT-JACOB.
Hygiène	BOYER.	Pathologie chirur- gicale	OLIVIER.
	DEPARIS.		POILLEUX.
Maladies infec- tieuses	BASTIN.		VERNE.
	DÉROBERT.		DEBOST.
Médecine légale et du travail ..	GAULTIER.		MATHEY.
	HADENGUE.		PIABEAU.
	ALBAHARY.		CAUCHOIX.
Neurochirurgie .	DAVID.		FAUREL.
Neurologie	LHERMITTE.	Pathologie expér. }	BARCAT.
			GERMAIN.
			THOMERET.
			MAURICE.
			LOEPER.

Pathologie médi- cale	{	BOUDIN.	{	Pédiatrie	JOSEPH.
		CASTAIGNE.			MOZZICONACCI.
		CONTE.			POLONOVSKY.
		DOMART.		Pharmacologie .	CHEYMOL.
		LAMOTTE.			M ^{lle} LÉVY.
		LAROCHE.		Physiologie	BARGETON.
		MILLIEZ.			PARROT.
Pathologie médi- cale	{	PEQUIGNOT.	{	Physique méd. ..	DEJOURS.
		PERRAULT.			GOUGEROT.
		RAMBERT.			DJOURNO.
		THIEFFRY.		Pneumo-Phtisiolo- gie	KREIS.
		TURIAF.		Psychiatrie	PICHOT.
		BRICAIRE.		Psychiatrie infan- tile	MICHAUX.
		ROYER.		Rhumatologie ..	DELBARRE.
		BRISSAUD.			M ^{me} CHAPUT.
		DEROT.		Stomatologie	CERNÉA.
		BOUVIER.		Thérapeutique ..	CHASSAGNE.
		MACREZ.		Urologie	KUSS.
		WOLFROMM.			

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES
CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent :

	MM.		MM.	
Clinique chirurgi- cale	{	AMELINE.	{	HAGUENAU.
		HUGUIER.		KOURILSKY.
		LÉGER.		MARCHAL.
		PADOVANI		
		ROUX.		ESCALLE.
Clinique médicale	{	RNDLER.	{	MAYER.
		BROUET.		
		N...		OFFRET.
		DREYFUS.		COUVELAIRE.

Secrétaire général de la Faculté J. MOREL.
Secrétaire M^{lle} CHAINTREUIL.

Conservateur, chargé de la Direction Docteur A. HAHN.
Conservateur M^{lle} GOICHON.
Bibliothécaires { M^{lles} DUMAITRE, LAURENT, LE NOIR,
QUIÉVRIEUX.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA FRANCE
ET
A L'UNIVERSITE DE PARIS

En reconnaissance de l'enseignement qu'elle nous ont prodigué.

A LA MÉMOIRE DE
MONSIEUR LE PROFESSEUR M. POLONOVSKI

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. F. JAYLE

Qui nous a fait l'honneur de pré-
sider cette thèse.

A NOTRE MAÎTRE EN PSYCHIATRIE

MONSIEUR LE PROFESSEUR HENRI BARUK

Un des pionniers de la psychiatrie
expérimentale chez les animaux.

AU « PATRON »

NOTRE MAÎTRE ET AMI

MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE CARTIER

Qui nous a si généreusement
accueillis dans son laboratoire et qui
nous a dirigés dans nos efforts.

INTRODUCTION

L'ÉNERGIE VITALE DU CERVEAU

Autant que le microscope et la découverte de la structure cellulaire de la matière vivante à toutes les échelles, ont pu ébranler les conceptions de la nature de l'homme, existant à cette époque, les études chimiques et physiologiques du XX^e siècle et surtout depuis les isotopes radioactifs, nous ont permis une appréciation beaucoup plus profonde de la substance vivante et ont affirmé sans possibilité d'erreur l'unité de celle-ci.

Les concepts anatomiques et structuralistes, qui ont eu leur apogée aux XVIII^e et XIX^e siècles, se voient remplacés actuellement par celui d'un dynamisme incroyable fait d'une action incessante à l'échelle moléculaire, que seules les techniques modernes nous laissent entrevoir dans ce microcosme qui est la cellule vivante.

Ainsi, en regardant de plus près, nous voyons que l'homme est plus qu'un assemblage de cellules et d'organes, et que son cerveau, notre sujet d'études, est autre chose qu'un kilo de masse pâteuse subdivisé en parties portant des noms latins hautement impressionnants, qui cernent la rigidité d'un concept de l'homme taillé d'après les planches anatomiques qui nous sont si familières.

Regardons à travers un microscope imaginaire jusqu'à l'échelle moléculaire. Là nous tombons dans la vraie vie grouillante, incessante, bruyante même et des milliers de fois plus passionnante que la vie de Paris, presque statique par comparaison.

Nous voilà à côté d'un corps de Nissl comme nous pouvons être au Champ-de-Mars à côté de la Tour Eiffel : mais attention !... les molécules se défont, celles qui sont grandes comme un immeuble tombent en miettes. Et là on voit des petits mor-

ceux qui se rassemblent et reconstituent un immeuble identique à celui détruit. Nous voyons des trous immenses qui apparaissent spontanément dans un mur pour laisser passer un éclair. Cela, c'est le début d'une pensée, cela est le psychisme et c'est à la fois notre instrument et notre sujet d'études.

Dans tout ce vacarme de synthèse et de dégradation, il y a une question primordiale qui frappe l'esprit. D'où vient l'énergie pour entretenir un tel déploiement de force ? Car après tout, n'est-ce pas l'énergie l'attribut fondamental de la vie ? Aujourd'hui, nous pouvons répondre avec une très grande précision à cette énigme qui montre comme aucune autre l'unité dans tout ce qui concerne la vie. Je dis ceci car après des billions d'années d'expérimentation et d'innombrables utilisations de l'énergie biologique, depuis le choc électrique de certains poissons (*Electrophorus*, etc.) et la luminescence des vers luisants (*Photinus pyralis*), jusqu'au travail musculaire et la pensée humaine pour ne pas parler des dépenses moins spectaculaires, telle la sécrétion hormonale, le travail osmotique et la synthèse des tissus, il n'y a qu'une seule forme d'énergie utilisable, celle-ci découverte grâce aux travaux de LOHMAN en 1929, et plus tard LIPMAN, KALCKAR et d'autres, étant l'énergie contenue dans une liaison ester d'un radical phosphorique, dite liaison « riche en énergie ».

Il s'agit presque toujours d'un des trois radicaux phosphoriques, d'un nucléotide spécial, l'adénosine triphosphate ou A.T.P.

Regardons ce corps de plus près : nous trouvons qu'il est formé de trois parties essentielles : une base purique, l'adénine, un sucre à cinq carbons : le ribose, et trois groupements phosphoriques dont les deux derniers sont les fonctions anhydres de l'acide et dont l'hydrolise libère approximativement 12.000 calories pour chaque radical séparé. Ce qui fait la « petite monnaie » énergétique de Syent Georgie.

Pour que cette énergie soit utilisable, il faut que deux conditions fondamentales soient remplies. Premièrement : que l'énergie une fois prise puisse être reconstituée ; et deuxièmement qu'elle puisse être mise en réserve pour que l'organisme ne s'en trouve pas dépourvu.

La mise en réserve est effectuée par le transfert enzymatique du groupement phosphorique à une molécule de créatine

pour former la phosphocréatine, cette réaction passant par la formation d'un complexe d'addition intermédiaire permettant un transfert interne d'énergie selon le schéma figure 1.

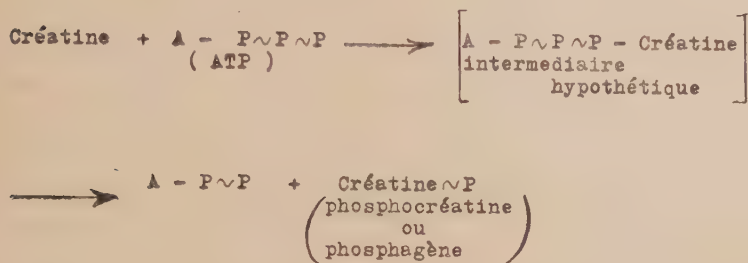


Fig. 1 : Note; nous indiquons la liaison de haut potentiel selon Lipman par le symbole $\sim$.

La reconstitution d'une de ces molécules d'A.T.P. à partir de l'A.D.P. peut s'effectuer, soit en empruntant un phosphoryle de la phosphocréatine ou par couplage avec un processus d'oxydation phosphorylante, qui en produisant une liaison anhydre de l'acide phosphorique réalise une redistribution des forces de résonnance électronique interne pour que l'énergie de la molécule soit concentrée dans notre liaison de haut potentiel. Ceci est naturellement une image hautement simplifiée mais qui nous permettra de considérer d'une façon extrêmement sommaire le rôle de l'A.T.P. dans le métabolisme des carbohydrates. (Note : la tendance actuelle est d'admettre un état de résonnance des forces électrostatiques non localisées et d'attribuer la grande quantité d'énergie à un effet de bas potentiel dans le réactant [2]).

Nous savons que la première étape du métabolisme glucidique, c'est-à-dire la formation du glucose-6-phosphate à partir du glucose, grâce à l'action d'un enzyme, l'hexokinase ; une molécule d'A.T.P. est dégradée en A.D.P. avec la libération concomitante de 12.000 calories.

Le glucose-6-phosphate est converti en fructose-6-phosphate par l'action d'une phosphohexoisomérase, qui en dégradant un deuxième A.T.P. se voit transformé en fructose-1-6-diphosphate, libérant à nouveau 12.000 calories.

La molécule diphosphatique ainsi formée est, par une série

de réactions enzymatiques, scindée en deux molécules de triose-phosphate qui en rendant leur phosphate à deux molécules d'A.D.P. reconstituent l'A.T.P. essentiel et sont eux-mêmes convertis en acide pyruvique, acide lactique ou ethanol selon les conditions prévalentes au moment de la réaction. Nous pouvons résumer cette dynamo énergétique dans le schéma proposé par LIPMAN [3] (Figure 2).

Ainsi, en étudiant le rôle du glucose dans la libération de l'énergie biologique, nous avons franchi l'étape-clé entre l'énergie solaire, reconnue depuis tous les temps comme la source unique de l'énergie terrestre, et l'énergie vitale qui nous anime.

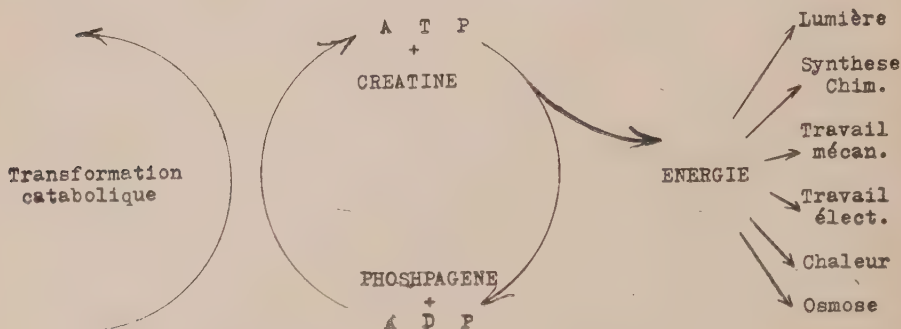


FIG. 2. — Dynamo énergétique de LIPMANN
(d'après BALDWIN)

Maintenant, ayant pris connaissance de cette activité microcosmique, considérons quelques-uns des moyens dont nous disposons pour l'examiner de plus près.

Nos études peuvent être faites *in vitro* par les techniques semblables à celles de WARBURG qui, en étudiant une coupe de tissu entretenue dans des conditions dites physiologiques, apprécie sa consommation d'oxygène ou d'autres métabolites dans le milieu ainsi que l'accumulation des déchets. Signalons comme exemples les études récentes de Mc ILLWAINE et ses collaborateurs en Angleterre qui ont étudié l'effet d'une stimulation électrique sur des coupes de cerveau *in vitro* montrent une augmentation dans la respiration tissulaire [4] ainsi que dans la concentration en acide lactique [5], et en phosphore inorganique [6], associé à une baisse parallèle dans la teneur en phosphocréatine.

HEALD [7], étudiant des coupes d'écorce par des moyens analogues, a trouvé une baisse initiale d'A.T.P. suivie en 2 ou 3 secondes par une dégradation de phosphocréatine qui dure à peu près cinq minutes, la resynthèse de la phosphocréatine étant effectuée dans les vingt minutes suivant la stimulation.

En étudiant l'activité fermentaire et notamment celle de l'anhydrase carbonique et phylogénétique, on trouve un maximum dans l'écorce des mammifères.

Toutefois, ce sont les études du cerveau *in vivo* qui nous semblent présenter un intérêt le plus saisissant.

Signalons d'intéressantes études avec les isotopes radioactives telles celles de GAITONDE et RICHTER [9] qui ont injecté de la méthionine contenant du S.35 directement dans le liquide céphalo-rachidien sous-arachnoïdien et ont pu suivre son incorporation dans les protéines tissulaires. Ils ont trouvé une période de 14 jours pour les liaisons méthionine dans les protéines du cerveau. C'est-à-dire que les molécules qui constituent notre cerveau aujourd'hui, ainsi que notre corps entier, ne sont pas les mêmes qu'il y a un mois et qu'ils se sont changés entièrement une multitude de fois depuis notre enfance.

Pour étudier chimiquement les changements si rapides qui font un système aussi dynamique que le métabolisme cérébral, il nous faut, après avoir établi les conditions de l'expérience que ce soit stimulation électrique, narcose, etc., arrêter instantanément l'action pour pouvoir ensuite analyser et doser les constituants. On réalise ce tour de force en plongeant l'animal vivant, ou au moins sa tête, dans de l'air liquide à moins 147° C. La tête étant immédiatement congelée à une dureté pierreuse, nous faisons la dissection avec un marteau et une cisaille. Il suffit ensuite d'effectuer les opérations ultérieures à une température proche de 0° C.

Pour ceci il faut disposer d'équipement spécial telle une chambre froide semblable à l'énorme glacière d'un boucher ; des conservateurs à moins 20° C et une centrifugeuse à température réglable. L'importance de ce premier temps de congélation à l'air liquide a été mise en évidence par divers chercheurs tels DAWSON et RICHTER [10] qui ont montré la rapide dégradation de l'A.T.P. décelable dans les 15 secondes qui suivent la mort.

On procède alors à l'extraction et purification des métabo-

lites par des moyens de la chimie classique, mais en opérant comme nous l'avons dit aux environs de 0° C.

Pour leur dosage, nous avons d'abord l'appréciation chimique des éléments caractéristiques (azote, ribose, P., etc.), mais ces méthodes sont imprécises largement à cause de l'impureté de l'échantillon. Il convient néanmoins de signaler le dosage de phosphore par la méthode colorimétrique de FISKE et SUBBAROW [11] car connaissant la P. totale et la P. hydrolysable nous pouvons déduire ce qui vient des esters phosphoriques notamment A.T.P. et A.D.P., bien qu'il soit difficile de faire la part qui revient à chacun de ces deux corps.

Les moyens biologiques tels l'action pharmacodynamique de l'A.T.P. sur le cœur de grenouille comportent une imprécision de l'ordre de 10 % et sont très rarement employés.

Par contre, l'analyse enzymatique, c'est l'appréciation de la vitesse d'une réaction produite grâce à un enzyme d'activité et concentration connues agissant sur une quantité inconnue de l'A.T.P. bien que très délicate à manier est d'une grande précision. Toutefois, on doit veiller sur la pureté de l'enzyme. Illustrons cette technique par la réaction de dégradation de l'A.T.P. catalysé par A.T.Pase dont on peut facilement suivre la libération de phosphate par les moyens colorimétriques.

ALBAUM [12] aux Etats-Unis, a beaucoup fait pour le développement de cette technique.

Parmi les moyens les plus utilisés actuellement se trouve la chromatographie sur papier ou sur colonne et l'électrophorèse sur papier qui permettent une séparation de quantités infinitésimales de ces corps chimiques selon la mobilité de leurs molécules entraînés soit par un courant de solvant, soit par un courant électrique. Une fois séparés, certaines substances organiques sont très facilement dosées par leur absorption sélective en lumière ultraviolette telle l'adénosine qui absorbe à 260 mμ mesurée grâce à un spectrophotomètre.

Avec le Professeur CARTIER au Laboratoire de l'Os et de la Croissance, nous avons mis au point une technique permettant de déterminer la répartition des phospho-dérivés de l'adénosine (A.M.P., A.D.P., A.T.P.), dans le tissu cérébral des rats blancs.

Après séparation des éléments isolés sur une bande de papier par l'électrophorèse, nous passons la bande entière devant la fente d'un spectrophotomètre inscrivant les variations d'ab-

sorption à 260 mmu, ce qui donne une courbe dont nous pouvons ensuite mesurer la surface par planimétrie. Nos expériences montrent que cette absorption est proportionnelle à la concentration d'A.T.P. sur le papier, ce qui permettrait une rapide analyse quantitative par comparaison avec une échelle standard établie en mesurant l'absorption à diverses concentrations connues.

Les dix dernières années ont vu une multitude d'expériences entreprises dans le but d'observer l'effet sur le métabolisme cérébral provoqué par une diversité de conditions physiologiques et autres.

En 1947, OLSEN et KLEIN [14] ont montré que l'activité musculaire intense de l'animal, produit dans le cerveau une diminution du nombre des liaisons phosphoriques de haut potentiel avec une augmentation de la glycolyse et de la concentration en acide lactique, tandis que le sommeil ou la narcose produisaient le contraire. Etudiant le chat soumis à des convulsions électriques, ils ont trouvé une chute de glucose, du glycogène de l'A.T.P. et de la phosphocréatine accompagnée d'une augmentation dans la teneur en phosphore inorganique et en acide lactique.

DAWSON et RICHTER [15], en 1950, ont pu établir que la chute de la phosphocréatine était beaucoup plus grande que celle de l'A.T.P. qui est reconstituée aux dépens de la première. Ils ont montré aussi que la phosphocréatine elle-même est reconstituée dans les 15 à 30 secondes suivant l'excitation.

Au III^e Congrès International de Biochimie, tenu en 1955 à Bruxelles, PALLADINE [16] de Kiev a rapporté les résultats d'analyses faites après excitation et inhibition du système nerveux. Ses études avec la prévitine et le cardiazol lui ont permis de conclure que l'excitation dans les limites physiologiques augmente le métabolisme avec maintien ou faible augmentation de la teneur en A.T.P. tandis que l'excitation forte donne un épuisement avec passage à l'état d'inhibition.

Pendant le sommeil, narcose ou hibernation, le métabolisme baisse, mais néanmoins reste considérable, permettant une restitution de la capacité de travail.

Je cite, pour leur intérêt psychiatrique tout particulier, les travaux de HAIKINA et KRATCHKO signalés par PALLADINE sur le métabolisme cérébral lors de son excitation par la rupture d'un

réflexe conditionné par une stimulation non conditionnée telle que la « collision » entre une stimulation, réflexe alimentaire (sonnerie) et une stimulation non conditionnée (courant électrique). Il se produit un état de tension nerveuse ayant les mêmes effets qu'une excitation chronique épuisante avec baisse d'A.T.P. et l'augmentation concomittante dans la teneur en phosphore inorganique, acide lactique et de la glycolise.

N'est-ce pas ceci un lien possible entre l'organique et le fonctionnel ? Enigme de la médecine moderne.

Le champ d'études que nous venons d'esquisser très brièvement ne fait que s'ouvrir. Nous attendons avec impatience des études de ce genre employant des procédés tels que les expériences dites psychotiques à la mescaline ou aux dérivés hallucinogènes de l'acide lysergique, ainsi que les différentes formes de névroses expérimentales.

Nous sommes à l'aube d'une époque nouvelle dans la compréhension de l'être par lui-même, une époque qui nous permettra peut-être un jour de connaître sinon l'essence de l'âme humaine au moins l'instrument à travers lequel elle se manifeste et qui joue un rôle, peut-être prépondérant dans ses maux [13].

Tout travail aussi modeste soit-il entrepris dans ce but est métamorphosé en aventure passionnante.

PREMIERE PARTIE

NOTIONS CLASSIQUES

CHAPITRE I

METHODES CLASSIQUES DU DOSAGE DES PHOSPHO-DERIVES DE L'ADENOSINE

Le dosage des divers phospho dérivés de l'adénosine est précédé par leur extraction des tissus et leur précipitation sous forme d'un sel insoluble.

L'extraction est généralement réalisée par broyage, soit avec de l'acide trichloracétique à 5 % environ, soit avec de l'acide perchlorique à 3 % environ. Cet extrait est ensuite neutralisé et les nucléotides sont précipités à l'état de sel insoluble dans l'eau, sels de barium, de calcium, de zinc, de plomb, de mercure, etc. Cet isolement peut être complété par une purification qui élimine les substances qui ont précipité en même temps que ces nucléotides, en particulier les phosphates. Ces sels insolubles sont ensuite remis en solution en milieu acide, débarrassés du métal, soit par précipitation (en particulier les sels de barium à l'état de sulfate de barium, les sels de mercure par précipitation à l'hydrogène sulfuré (en sulfure de mercure), soit par passage sur une résine cationique et la solution est ensuite neutralisée et amené à l'état de sel de sodium ou de potassium.

Le dosage proprement dit des phospho-dérivés de l'adénosine peut être réalisé par différentes méthodes qui découlent des propriétés physiques, chimiques ou enzymatiques de ces composés.

I. — LES MÉTHODES DE DOSAGE CHIMIQUE consistent à doser simultanément le phosphore hydrolisable en milieu chlorhydrique à 100° C en dix minutes (qui correspond aux liaisons pyrophosphates de l'A.T.P.), le pentose par la réaction colorée de l'orcinol et à déterminer le rapport moléculaire des deux pour préciser s'il s'agit d'une combinaison di- ou tri-phosphorée de l'adénosine. Ce dosage direct fournit des indications imprécises car il s'adresse à un mélange assez complexe de phospho-dérivés et il devient impossible de définir le rapport de concentration des différentes formes avec une précision supérieure à 10 %. Ces dosages chimiques du pentose et de l'acide phosphorique complétés par le dosage spectrophotométrique n'ont de signification et de précision satisfaisantes que si elles s'appliquent à des composés au préalable séparés.

II. — LES MÉTHODES ENZYMATIQUES présentent sur ces dernières un double avantage : d'une part ce sont des méthodes spécifiques qui ne nécessitent pas une purification préalable et un isolement des divers phosphonucléotides ; d'autre part ces techniques sont d'une sensibilité telle qu'elles décèlent des concentrations en nucléotides couramment de l'ordre du gamma, souvent même inférieur à ce chiffre.

Leur principe général consiste à utiliser une réaction enzymatique où l'un quelconque de ces phospho-dérivés joue un rôle spécifique. Par exemple, l'acide adénosine triphosphorique peut être dosé enzymatiquement par son action de donneur de radicaux phosphoryles dans la phosphorylation du glucose en présence d'hexokinase qui le transforme en glucose-6-phosphate. Le dosage du glucose-6-phosphate (qu'on sait réaliser avec une grande précision) donnera donc indirectement la concentration en A.T.P. dans le milieu. Un autre exemple est fourni par l'hydrolyse phosphatasique spécifique de l'acide adénosine tri-phosphorique réalisée par la myosine. La tri-phosphatase scinde l'A.T.P. en A.D.P. en libérant le dernier acide phosphorique qui peut être dosé directement dans le milieu. L'inconvénient de ces méthodes enzymatiques est qu'elles nécessitent l'emploi de systèmes enzymatiques purifiés difficiles à préparer et à conserver et souvent l'emploi de substrats de préparation également délicate.

III. — Les inconvénients de ces diverses méthodes ont conduit à rechercher des techniques relativement simples d'isolement des divers phospho-dérivés auxquelles on peut ultérieurement appliquer les méthodes de dosage chimique ou spectrophotométrique. Cet isolement est réalisé soit par chromatographie sur résine échangeuse d'ion, soit par ionophorèse. La chromatographie sur papier peut être réalisée avec divers solvants généralement acides, qui fournissent une séparation souvent incomplète. Leur inconvénient majeur est la durée de séparation dans un milieu acide (20 à 60 heures) qui risque de provoquer une légère hydrolise des phospho-dérivés. Le meilleur solvant chromatographique pour séparer l'AT.P., A.D.P. et A.M.P. est un mélange ternaire d'acide isobutyrique, d'ammoniaque et d'eau, que son odeur désagréable rend d'un emploi malcommode.

La séparation sur résine échangeuse anionique, Dowex 2, Deacitite (technique de COHN et CARTER). Le passage d'un extrait brut contenant les différentes nucléotides sur ces résines anioniques montre que les nucléotides sont fixés par la colonne et peuvent éluer sélectivement en faisant varier, soit la concentration acide, soit la concentration ionique de l'éluant. Le recueil des diverses fractions et la mesure de leur absorption en lumière ultra-violette permet de déterminer la concentration et la répartition des divers phospho-dérivés. Cette technique (qui représente la technique de référence) est laborieuse et délicate et ne peut être appliquée à des dosages en série.

La séparation électrophorétique nécessite des prises d'essai du même ordre de grandeur que celles employées dans la chromatographie sur papier. Elle permet une séparation très rapide des phosphodérivés en pH légèrement acide ne risquant pas de provoquer une hydrolise notable de fractions poly-phosphorylées. Cette électrophorèse est habituellement réalisée sous voltage élevé (20 à 30 volt/cm) à pH compris entre 3.5 et 4 à une faible force ionique qui ne provoque pas un échauffement notable de la bande par le passage du courant. La séparation est généralement satisfaisante au bout de 45 minutes et la prolongation du temps d'électrophorèse à une heure trente, donne une résolution parfaite des différents constituants nucléotidiques du mélange. C'est cette dernière technique que nous avons adopté pour séparer les dérivés phosphorylés de l'adénosine et dont nous avons donné dans le chapitre II les détails de sa réalisation.

CHAPITRE II

RAPPEL DE LA STRUCTURE ET DES PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES PHOSPHO-NUCLEOTIDES

I. — La structure

Ces nucléotides, comme nous l'avons signalé plus haut, sont constitués par une base purique ou pyrimidique, un sucre et de l'acide phosphorique (voir figure 3).

Jusqu'à présent, il a été généralement admis que seule l'adénosine tri-phosphate formée de l'adénine, le d-ribofuranose et trois radicaux phosphorylés, ainsi que ses produits de déphosphorylation : l'adénosine di-phosphate et l'adénosine mono-phosphate, joue un rôle d'accumulateur d'énergie dans le métabolisme intermédiaire. Récemment, d'autres structures analogues ont été mises en évidence dans les tissus, et dans lesquelles l'adénosine est remplacée soit par une autre base purique, la guanine (2-amino-6-oxypurine) donnant naissance à d'autres phosphonucléotides, le guanosine-tri-phosphate (G.T.P.) et ses produits dérivés mono et di-phosphorylés (G.M.P. et G.D.P.). Soit par des bases pyrimidiques tel l'uracil ou la cytosine donnant à leur tour des dérivés mono, di ou triphosphatés. Il est vraisemblable que ces phospho-dérivés peuvent eux aussi jouer un rôle analogue à celui de l'A.T.P. dans les réactions métaboliques spécifiques. Dans la formule structurale [18], telle qu'elle a été proposée par LOHMANN (1932, 1935) — et confirmée en 1945 par LYTHERGÆ et TODD [19], le ribose se trouve lié par son premier C à l'azote en position 9 de l'adénine et par son 5' C aux premiers des trois radicaux phosphorylés (adénosine-5-phosphate) tel que le montre l'hydrolyse enzymatique de l'acide ribose

nucléique dont les produits principaux sont les 5'-phosphatés de l'adénosine, la guanosine, l'uridine et la cytidine. Néanmoins,

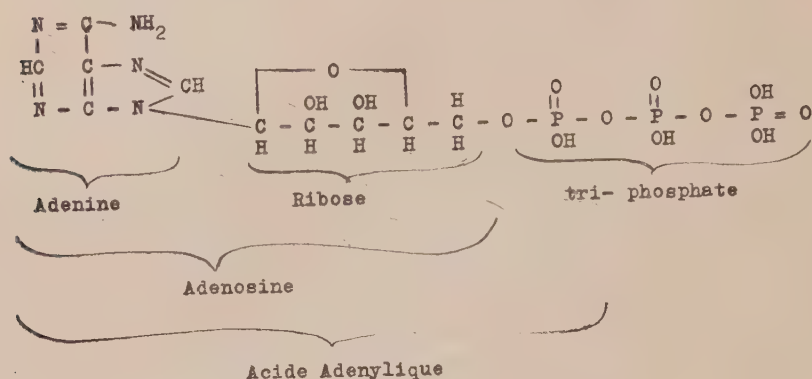


FIG. 3. — Adénosine tri-phosphate

L'hydrolyse alcaline montre l'existence d'une adénosine -3'-phosphate et d'une adénosine -2'-phosphate dans les acides nucléiques extraits de la levure.

II. — Les propriétés physiques et chimiques

Une des principales propriétés physiques des nucléotides, pour notre étude est l'état d'ionisation dans lequel ils se trouvent grâce à leurs esters phosphoriques, qui donnent à ces nucléotides une acidité plus forte même que l'orthophosphate inorganique. Leur pH est d'environ 1 pour la première dissociation et 6 pour la seconde. Cette forte ionisation nous est précieuse pour leur séparation électrophorétique.

La deuxième propriété sur laquelle est basée notre technique est l'absorption maximum très étroite à 260 mmu caractéristique de l'adénine en solution neutre ou légèrement acide. Cette bande d'absorption caractéristique n'est pas partagée par la guanine, la cytosine, l'inosine, mais elle l'est pour l'uracil.

L'A.T.P. libre qui peut être isolé par traitement de son sel de barium avec de l' H_2SO_4 et ensuite avec de l'acétone montre une rotation optique $(\alpha)^{25} = -26,7^\circ$ ($c = 3,095$).

Il est facilement soluble dans de l'eau et sa solution aqueuse

à 1 % ayant un pH aux environs de 2 est stable à 0° pendant plusieurs heures. Habituellement préparé par précipitation de son sel de barium qui à l'état anhydre est stable, mais qui se décompose lentement dans sa forme hydratée.

La formule de son sel de barium anhydre est $C_{10}H_{12}N_5O_{13}P_5Ba_2$ que représente 15,4 % C ; 1,56 % H ; 9,8 % N ; 11,5 % P ; 35,3 % Ba, ayant un poids moléculaire de 777,82. Son sel sodique, plus maniable, est stable en solution aqueuse de pH 6,8 à 7,4 à 0° pour une semaine environ. En solution acide, il peut être gardé pendant plusieurs heures, mais sa solution alcaline est rapidement convertie en acide 5-adénylique et en pyrophosphate de soude même à 0°.

SOLUBILITÉ DES SELS

Classiquement [20], l'isolement des phosphates organiques, tel que nous le considérons ici a été effectué en profitant de la différence de solubilité de ses sels de barium, de mercure et de plomb. Ces méthodes ont encore leur indication dans un premier temps de purification préalable aux méthodes chromatographiques ou ionographiques. La solubilité des sels de Ba est particulièrement utile car elle dépend du nombre d'atomes de Ba dans le sel ; c'est ainsi que les composés ayant plus d'un phosphate ou bien un radical carboxylique supplémentaire, donnent des sels insolubles dans l'eau. Les composés neutres ne contenant qu'un phosphate sont solubles dans l'eau, mais peuvent être précipités par 2 à 4 volumes d'alcool éthylique.

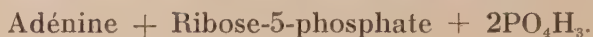
La précipitation des sels de mercure est utile pour la séparation des nucléotides des autres esters phosphoriques, comme le sont les sels de Pb.

Signalons que l'adsorption sur charbon peut aussi être utile dans un premier temps de purification, surtout quand on aura à faire à des volumes importants.

La 5'-A.M.P., A.D.P. et A.T.P. sont aussi précipités d'une façon quantitative par le sulfate de cuivre et l'hydroxide de calcium, alors que les 2' ou 3' nucléotides ne le sont que partiellement.

Le chauffage à 100° C en milieu acide (généralement HCL, N) provoque une hydrolyse des liaisons pyrophosphates et de la liaison oxidique (qui relie l'adénosine au ribose). Cette hydro-

lyse est à peu près totale en 7 minutes et scinde l'A.T.P. en :



Le dosage des ions PO_4^{+++} libérés par cette hydrolyse acide (généralement prolongée pendant 10 minutes pour la rendre complète), permet de déterminer la concentration en A.T.P.

DEUXIEME PARTIE

EXPERIENCES PERSONNELLES

CHAPITRE I

PREPARATION DU TISSU CEREBRAL PAR CONGELATION A L'AIR LIQUIDE

Nous avons signalé plus haut l'importance capitale d'avoir une congélation rapide pour pouvoir arrêter toute activité biochimique instantanément et ainsi saisir sur le vif notre tableau du métabolisme cérébral. Car comme nous avons dit, 30 secondes suffisent pour que la concentration en A.T.P. soit réduite de moitié. Cette congélation peut être effectuée dans de l'air liquide à -147° C ou dans l'azote liquide à -196° C. Ce dernier ayant l'avantage d'être moins dangereux à manier, étant moins explosif. Nous avons employé les deux indifféremment car leur action est identique pour les besoins de l'expérience (1).

Nous voyons ici un des grands avantages de travailler avec des petits animaux qui peuvent être facilement immergés et dont le cortex est congelé dans les 3 secondes, même à travers la boîte crânienne, tandis que pour les chiens ou autres animaux plus grands, il faut ouvrir le crâne par intervention chirurgicale pour en verser l'air liquide ensuite.

Dans notre expérience portant sur une centaine de rats blancs pesant de 250 à 350 gr., nous avons employé diverses techniques de sacrifices, chacune ayant des avantages et des inconvénients particuliers à elle.

(1) Nous remercions vivement notre ami le Professeur H. ALBAUM de New-York qui lors d'un séjour à Paris en 1955 a bien voulu nous initier à ses techniques de dissection après congélation.

Dans les premières séries, nous avons anesthésié les rats avec 1,5 cc de chloral pour 100 gr., les tuant ensuite par immersion. Ceci est très difficile à standardiser car, mise à part l'action propre de l'anesthésie sur le métabolisme cérébral, chaque rat a une sensibilité différente aux anesthésiques. Pour plusieurs séries nous avons décapité les rats sans préparation préalable au moyen d'un grand ciseau laissant la tête tomber immédiatement dans un vase de Dewar contenant de l'air liquide.

Cette technique est très efficace pour des petits rats de 200 à 250 gr., mais avec des animaux plus grands on peut perdre plusieurs secondes à effectuer la décapitation. Toutefois, cette technique peut donner une grande précision à ceux qui peuvent s'équiper d'une guillotine appropriée. Par ailleurs, elle permet de réaliser des économies assez importantes d'air liquide étant donné que la tête seule est congelée.

Nous avons finalement adopté la procédure d'assommer le rat contre une table et tenant la queue dans une main gantée, plonger la tête dans l'air liquide. Après trois ou quatre minutes nous sortons l'animal dont seule la tête et le cou sont congelés pour le décapiter, remettant la tête dans l'air liquide pendant que nous nous occupons avec l'animal suivant, de telle façon que chaque tête reste un minimum de 10 à 15 minutes dans l'air ou l'azote liquide.

La dissection se fait au marteau et cisaille, et une fois une certaine habileté acquise, on doit pouvoir sortir le cerveau chaque hémisphère en un seul morceau, mais pour faire ceci chaque coup doit être bien placé, tel que pour tailler un brillant. Il est presque indispensable d'avoir une aide pour tenir l'animal fixe. Pour séparer la tête du corps sans léser le cervelet, on place la cisaille sur la ligne médiane, juste au-dessus d'une ligne joignant les pattes antérieures. Ensuite, la tête bien fixée sur la table (ou plateau) de dissection, on porte un coup sec sur la cisaille placée sur la ligne médiane un peu en arrière des deux yeux pour que la tête soit clivée en deux parties symétriques, chacune contenant un hémisphère entier ; on remet alors un des morceaux dans l'air liquide pendant qu'on continue avec l'autre. C'est le troisième coup qui détermine le succès de la dissection, car s'il est bien porté, juste au-dessous du bord inférieur du cerveau, l'hémisphère sort en bloc et la séparation de cerveau et cervelet est extrêmement facile sans qu'aucun autre tissu en soit mélangé.

CHAPITRE II

EXTRACTION ET PURIFICATION DES NUCLEOTIDES

Une fois disséqué le tissu est mis dans un Becher contenant un minimum d'acide trichloracétique (TCA) 20 %, soit 15 à 20 cc à 0° C, le tout étant préalablement taré. Les rats blancs de Laboratoire pesant de 250 à 350 gr. donnent habituellement 1 gr. de cerveau et 0,30 à 0,40 gr. de cervelet. Dans nos premières séries nous avons groupé le tissu venant de 4 ou 5 rats, mais une fois nos techniques établies, on a pu se contenter de 2 rats par série.

Le tissu est ensuite homogénéisé dans un tube de Potter, puis centrifugé à froid. Nous avons employé une centrifugeuse à température contrôlable tenue à 4° C, tournant à 4.500 rpm. Le culot de centrifugation est jeté et le surnageant neutralisé au point de virage du bromothynol bleu, soit pH 7,4 avec NaOH, 2N. Une fois neutralisée, la préparation peut être gardée au froid de 0° à 4° C pendant un certain temps sans inconvénient si le besoin en est, toutefois, le délai ne doit pas dépasser quelques jours avant de continuer l'extraction.

HEALD a signalé [21] que par centrifugation à haute vitesse on a une séparation complète du résidu tissulaire avec peu de phosphore restant dans les extractions ultérieures ; tandis qu'une centrifugation à moindre vitesse laisse un surnageant opaque contenant probablement des phospholipides et dont les extractions suivantes montrent un taux de phosphore égal à 50 % de celui du premier.

Nous pouvons préciser que cette opalescence qui se trouve dans le surnageant des préparations de cerveau ne se retrouve pas dans les extractions faites à partir du cervelet, même à une vitesse de centrifugation assez basse de l'ordre de 2.500 tours par minute. Ceci est probablement en rapport avec une teneur plus importante en phospholipides dans ce premier. On

ajoute 2 volumes d'alcool éthylique 95 % à 0° C, plus 0,01 volume d'acétate de barium à 51 %, et on laisse 24 heures en chambre froide pour précipiter l'A.T.P., A.D.P. par son sel de Ba. Puis on centrifuge de nouveau à froid et on fait sécher sous vide, le produit est prêt pour l'analyse.

Parmi les diverses méthodes que nous avons expérimentées, signalons l'extraction à l'acide perchlorique (P.C.A.), sa neutralisation, qui doit être effectuée avec de la potasse saturée (KOH), précipite des chlorures qui ne peuvent être complètement éliminés sans centrifugation et éventuellement passage sur une colonne de permutite avant l'analyse et la séparation par électrophorèse.

Une autre méthode qui peut être intéressante et que nous avons employé pour quatre séries de mises au point, consiste à ne faire aucune purification chimique et aussitôt que le premier liquide d'extraction est neutralisé, de le sécher par lyophyllisation et procéder ensuite à son analyse chimique et son électrophorèse.

CHAPITRE III

L'ANALYSE CHIMIQUE

Le produit séché, ce qui est pour deux rats de l'ordre de 100 mg. extrait du cerveau et 60 mg. extrait du cervelet, est repris dans un minimum d'eau auquel on peut avoir besoin d'ajouter de l'acide chlorhydrique pour solubiliser (soit 0,5 cc H_2O + 0,5 cc HCl N). On prélève deux fois, 50 lambda (soit 0,10 cc) pour l'électrophorèse et on ajoute 0,5 cc SO_4Na_2 à 20 % pour précipiter le Ba.

Après centrifugation, rincer le culot et neutraliser le surnageant avec $NaOH$ N jusqu'au virage d'un papier indicateur, puis compléter à 5 cc. On est alors prêt à doser le phosphore par la technique de FISKE et SUBARROW [11] qui permet l'appréciation photométrique de la densité de coloration produit par la réaction ci-dessous et comparée à une échelle standardisée pour l'appareil. Nous pouvons ainsi doser le P direct, le P après 10 minutes d'hydrolyse, aussi bien que le P total.

Notons que le P hydrolysable (soit $P_{\Delta^{10'}}$ — P_{Direct}) (dit :

P

PO_4) provient de l'A.T.P., A.D.P. et A.M.P.

Nous pouvons dire :

$$1^\circ P_{total} - P_{PO_4} = P_{organique} \text{ (ou } \Delta P_{total} \text{)} ;$$

$$2^\circ \text{ si } P_{hydrol.} = P_{ATP}$$

$$P_{hydrol.} \times \frac{3}{2} = P_{organique} ;$$

$$3^\circ P_{hydrol.} \times \frac{P.M. \text{ adénine (soit 135)}}{P.M. \text{ de pyrophosphate (soit 62)}} = \text{Adénine}$$

Après le dosage chimique nous pratiquons une estimation spectrophotométrique de l'adénine.

DOSAGE DU PHOSPHORE DIRECT (P PO₄)

Dans une fiole ou tube jaugés pour 25 cm³, on met successivement :

— solution à doser	1 cm ³
— molybdate (NH ₄ (sulfurique)	2,5 cm ³
— aminonaphtol	1 cm ³

Compléter immédiatement à 25 cc avec de l'eau distillée, agiter et mettre à l'étuve à 37° pendant 10 minutes à la température du laboratoire, puis lire au photomètre avec un écran rouge.

DOSAGE DU PHOSPHORE HYDROLYSABLE.

Dans un tube de 25 cm³ qui peut être fermé par un bouchon émeri, nous mettons :

— solution à doser	1 cm ³
— ClH ₂ N	1 cm ³

Le tube est placé dans un bain-marie à 100° C pendant 10, 30 ou 60 minutes selon la technique employée, puis on fait rapidement refroidir et doser comme le P
PO₄.

DOSAGE DU PHOSPHORE TOTAL.

On doit d'abord effectuer la destruction avec 0,5 cm³ PCA 50 % dans un tube en pyrex laissé pendant quelques heures dans un bain de sable. Reprendre par un peu d'eau et doser avec 2,5 cm³ de molybdate à 25 % sans acide. Certains préfèrent un traitement de 20 minutes au bain-marie à 100° C avec 1,25 cm³ SO₄ après la destruction et avant dosage.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'AMINONAPHTOL.

Dissoudre 125 mg. d'acide aminonaphtol-sulfurique dans 50 cm³ de métabisulfite de soude. Agiter, puis éclaircir cette solu-

tion trouble en ajoutant goutte à goutte du SO_4Na à 20 % (soit 1 gr. dans 5 cm^3), ensuite filtrer et garder pour usage ultérieur.

Pour la solution de métabisulfite, dissoudre 13,6 gr. de métabisulfite broyé dans 60 cm^3 d'eau distillée. Chauffer si nécessaire puis, après refroidissement, compléter à 100 cm^3 dans une fiole jaugée.

CHAPITRE IV

SEPARATION PAR ELECTROPHORESE

La théorie de l'électrophorèse qui permet la séparation des micro-quantité d'une substance à partir d'un mélange selon la mobilité propre à chaque molécule dans un champ électrique, est aujourd'hui bien connue. Cette technique développée en 1925 par TISELIUS [22] est l'application à l'analyse chimique des phénomènes de migration de frontière observés par SVEDBERG dans ses travaux d'ultra-centrifugation. Dans les deux cas on avait besoin d'un appareillage optique assez important pour suivre le déplacement d'une frontière entre substances incolores selon les modifications dans leur indice de réfraction.

Les détails de ces techniques et les considérations théoriques sont étudiés dans l'ouvrage d'ALEXANDER et JOHNSON [23] et dans les publications de SVENSSON [24].

L'adaptation de ces méthodes dans un milieu solide et surtout l'électrophorèse sur papier ont permis par leur grande simplicité l'énorme diffusion et diverses applications que connaissent actuellement ces techniques. Une exposition de la théorie de KUNKEL et TISELIUS [25] pour l'électrophorèse sur papier, ainsi qu'une introduction aux diverses techniques et appareils couramment employés est donnée par LEDERER [26].

Nous allons décrire seulement les techniques que nous avons employées pour la séparation des phosphodérivés des nucléotides cérébrales et qui ne sont qu'une adaptation des techniques mises au point par le Professeur P. CARTIER [27] au Laboratoire de l'Etude de l'Os et de la Croissance pour la séparation de ces mêmes et d'autres substances à partir du tissu hépatique et osseux.

L'appareil.

Nous avons employé un appareil de type préconisé par WIELAND et FISCHER [28] qui consiste en un bac horizontal et un dispositif électrique permettant de mettre le papier en circuit avec un galvanomètre, un milliampèremètre, et une source de courant continu de l'ordre de 1.000 volts.

PRÉPARATION DU PAPIER ET MISE EN MARCHÉ.

Des bandes de papier Whatman N° 3 ou Whatman N° 1 sont découpées d'une longueur de 20 cm par 2,5 cm de largeur et lavées soigneusement pour éliminer les impuretés métalliques (Ca^{++} et Mg^{++}) qui peuvent troubler la migration, ainsi que les impuretés organiques qui peuvent donner des zones visibles en U.V. et susceptibles d'être confondues avec les produits à analyser. Le lavage est effectué avec du « complexon » ou acide formique, 1 N.

L'application sur le papier de la substance à analyser se fait par distribution égale le long d'une ligne perpendiculaire à l'axe du papier à 5 cm d'une extrémité, la ligne étant préalablement tracée au crayon. Ceci est accompli grâce à une micro-pipette jaugée pour 50 λ et peut être fait soit sur le papier sec, soit sur le papier mouillé. L'application sur papier sec est un travail assez lent et pénible mais permet des observations en lumière ultra-violette en cours de route, aidant à déterminer la quantité nécessaire pour que les zones une fois séparées soient lisibles. Toutefois la séparation par cette méthode n'est pas supérieure à celle obtenue après application sur papier mouillé. La bande ainsi préparée est maintenant mouillée de part et d'autre de la ligne de départ de la substance à analyser, grâce à une petite éponge imbibée de solution-tampon, puis fixée soigneusement avec les deux extrémités dans les bacs de tampon et de façon à éviter que la bande puisse s'affaisser au milieu. Nous faisons agir une différence de potentiel de 800 volts pendant une heure et demie ou deux heures. Pendant ce temps le courant, facilité par le chauffage du papier, passe de 2 à 4 ou 5 milliampères pour une bande unique et davantage si on traite deux bandes simultanément.

Pour l'application sur bande mouillée, nous laissons la bande, la ligne de départ marquée au crayon, s'équilibrer dans l'ap-

pareil sous tension de 800 volts pendant 30 minutes avant d'y déposer la substance à analyser. Dans les deux cas la ligne de départ doit se trouver plus près de la cathode.

L'électrophorèse est terminée après 60 ou 90 minutes. Les bandes peuvent alors être séchées au four à 90-100° C.

La solution-tampon.

Nous avons trouvé notre meilleure séparation en employant un tampon citrate citrique à pH 3,5 ayant une molarité de 0,04 M. Une solution-stock est préparée avec :

Acide citrique	21 gr./litre
Citrate trisodique	71,42/litre

Avant usage, le stock est dilué à 400/1.000.

Nous avons trouvé que le même tampon préparé à partir d'acide citrique 0,5 M (85 cc/litre) et amené à pH 3,5 avec NaOH 2N n'a pas donné une aussi bonne séparation. On a aussi expérimenté un tampon d'acide succinique ayant une force ionique de 0,45 quand neutralisé à pH 6,5 par NaOH N tel que le suggère WALLENBERGER [29], mais la séparation après une heure et demie est moins complète que celle obtenue à des pH moins élevés. HEALD [21] a déjà montré que l'A.T.P. et l'A.D.P. ne sont pas séparables à pH 8,6, malgré qu'à ce pH ils peuvent être séparés du P inorganique. Il a employé cette acidité à 400 v. et 0,5 à 0,8 mA/cm pendant 6 heures sur papier Whatman n° 3.

WADE et MORGAN [30] ont trouvé un certain chevauchement de l'A.T.P. et du P inorganique avec un tampon d'acétate à pH 4. Il faut veiller sur la pureté du tampon et le changer fréquemment, car il y a non seulement contamination par les électrodes de charbon ou par les bandes mêmes, mais aussi des modifications par évaporation du tampon chauffé par le passage du courant électrique.

Nous trouvons les meilleures séparations et les migrations les plus uniformes quand on emploie des bandes assez minces (2-3 cm) et une seule bande à la fois, quoique le bac soit construit pour traiter plusieurs bandes simultanément. Dans l'ionophorèse simultanée de plusieurs bandes, il se produit des courants parasites qui peuvent altérer la bonne migration.

LOCALISATION ET IDENTIFICATION DES ZONES ÉLECTROPHORÉTIQUES.

Etant donné que les substances recherchées sont ici incolores, leur localisation dépendra sur les propriétés, soit physiques, soit chimiques. Les nucléotides, grâce à leur absorption sélective en lumière ultra-violette à une longueur d'onde déterminée — soit 260 mmu (2.600 Å) — sont immédiatement visibles à l'œil nu à cette longueur d'onde.

La localisation des phosphates dépendra d'une réaction colorée. Il en existe plusieurs, dont nous avons employé deux qui dépendent de la coloration en bleu par la réaction du phosphate avec le molybdate d'ammonium.

Dans la première technique, la bande sèche est pulvérisée par une solution de molybdate nitrique, puis séchée au four pendant une demi-heure à 70-80° C.

Pulvérisée à nouveau avec une solution de benzidine et séchée à la température ambiante, mais cette fois-ci en chambre noire. On peut accélérer ce deuxième séchage par brassage d'air avec un ventilateur. Une troisième pulvérisation à l'acétate de soude va compléter la révélation, mais les zones colorées doivent être relevées immédiatement, car la réaction est fugace. Les solutions employées sont les suivantes :

1^{re} solution :

— Molybdate d'ammonium	5 gr.
— Eau, q.s.p.	100 cm ³
— NO ₃ H concentré	35 cm ³

2^e solution :

— Benzydine	50 mg.
— CH ₃ COOH concentré	100 cm ³

3^e solution :

— Acétate de soude concentrée.

Une deuxième technique qui est peut-être plus maniable est celle de HANES et ISHERWOOD [31] modifiée par BURROWS. La solution réactive est pulvérisée sur la bande qui est ensuite séchée au four 5 minutes à 80° C, puis irradiée 5 minutes en

lumière Wood. Les phosphates sont alors colorés en bleu foncé, mais il se peut que le fond blanc soit, lui aussi, plus ou moins coloré. Si cela arrive, on peut diminuer le fond bleu en exposant le papier aux vapeurs d'ammoniaque et redévelopper ensuite, si nécessaire, par une nouvelle exposition à la lumière de Wood.

Réactif d'Hanes-Isherwood.

— Molybdate d'ammonium	1 gr.
— Eau distillée	8 cm ³
— HCl concentré	3 cm ³

Après dissolution, ajouter :

— P.C.A. à 70 %	3 cm ³
-----------------------	-------------------

Compléter avec :

— Acétone pure q.s.p.	100 cm ³
----------------------------	---------------------

Une troisième technique décrite par WADE et MORGAN [30] donne, après pulvérisation successive par des solutions alcooliques de FeCl_3 et de l'acide sulphosalicylique, une localisation des phosphates en blanc sur un fond violacé.

En figure n° 4 on voit les positions révélées par l'U.V. et par la réaction d'HANES et ISHERWOOD. La migration dépendant de la charge ionique aussi bien que du poids moléculaire, l'A.T.P. se déplace plus loin que l'A.D.P. qui lui-même dépasse l'A.M.P. WALLENBERGER [29] travaillant avec des extraits du muscle dans un appareil de KUNKEL et TISELIUS sur papier Munktelle 20 et un tampon de succinate à pH 5,6, a trouvé une migration vers l'anode par ordre de vitesse, de phosphocréatine, A.T.P., A.D.P., A.M.P., D.P.N. oxi et vers la cathode, d'anserine et créatine.

Nous avons trouvé pratique de n'effectuer les localisations de phosphate que sur la moitié ou le tiers de la bande, coupée dans son axe longitudinal.

Nous trouvons régulièrement quatre zones visibles en U.V. de 259 m μ (Mineral Light) et dans les premières séries pratiques sans purification chimique nous avons souvent trouvé une ou deux zones d'une faible fluorescence jaune en U.V. qui ne migre que très peu vers l'anode. Leur déplacement atteint à peine un à deux centimètres depuis la ligne de départ. Nous n'avons pas pu l'identifier.

Nous nous sommes bornés à l'identification des dérivés phosphatés des nucléotides, ceci pouvant être effectué par diverses techniques.

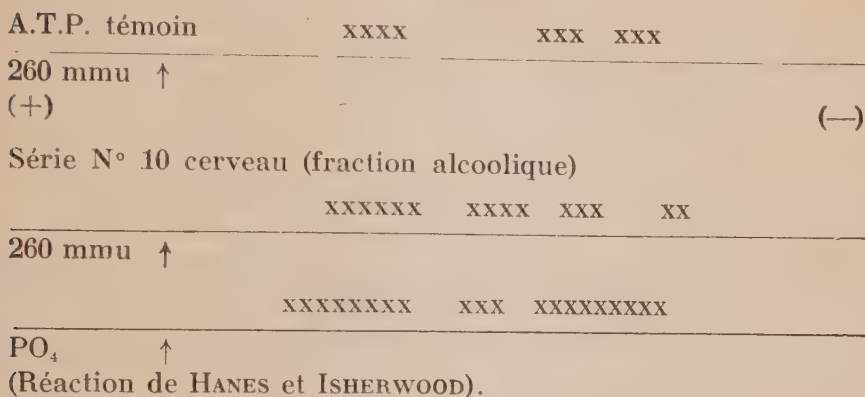


FIG. 4. — Positions relevées par la lumière U.V. à 260 mmu et par la révélation du phosphate après électrophorèse de 60 minutes dans un tampon de citrate à pH 3,6.

Premièrement, la comparaison de la migration à conditions identiques avec un échantillon d'A.T.P. témoin, tel qu'il est montré dans le schéma n° 4.

Une analyse qualitative ou même quantitative peut être faite en prélevant les zones par élution. Une ou plusieurs zones analogues sont découpées de la bande et ensuite coupées dans de très petits morceaux qui sont hydrolysés avec quelques cm³ de HCl N.

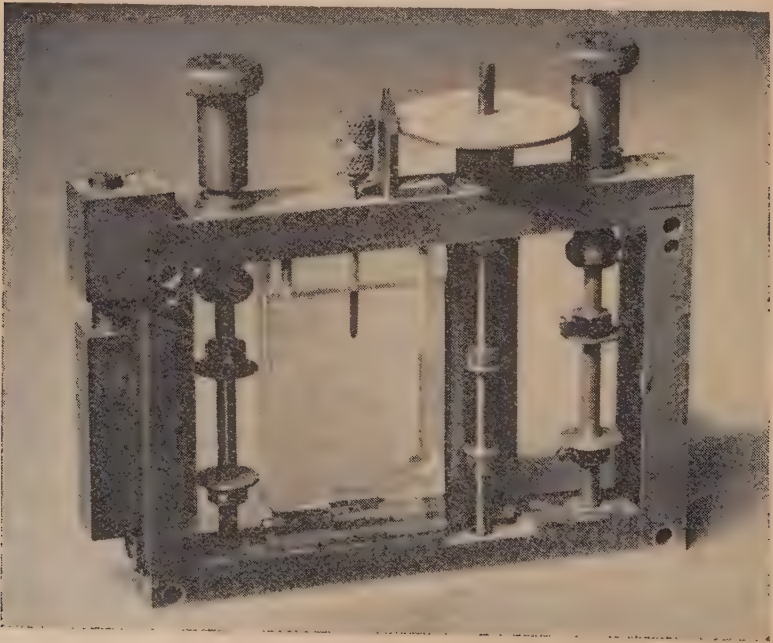
Puis on filtre et on sèche sous vide le liquide d'élution qui peut être repris dans un peu d'eau pour chromatographie, analyse chimique ou spectrale.

L'analyse du P dans les zones peut être faite par la destruction directe de la zone découpée dans un mélange destructeur de H₂SO₄HNO₃ et P.C.A. suivi par son dosage selon la technique de FISKE et SUBARROW [11] décrite plus haut.

CHAPITRE V

ESTIMATION PAR SPECTROPHOTOMETRIE

L'analyse spectrale dans les techniques classiques a toujours été faite sur le liquide d'élution d'une zone électrophorétique, ceci étant un procédé très lent et considérant les microquantités en jeu, il y avait une possibilité de perte plus ou moins importante.



Bobine de CARTIER
pour la lecture des bandes électrophorétiques dans un septrophotomètre

Grâce à la bobine développée par le Professeur Pierre CARTIER (voir planche I) et la technique mise au point dans son

Laboratoire, nous avons pu déjà en 1951 mesurer l'absorption, directement sur le papier en déroulant la bande préalablement imbibée d'huile de parafine, devant la fente d'un spectrophotomètre de BECKMAN. Cette technique précurseur dans ce genre, a été subséquemment remplacée par le développement d'appareils spécifiquement adaptés à la lecture directe de l'absorption spectrale sur papier. Ainsi, nos 20 dernières séries ont été lues avec un densitomètre électronique adapté pour l'ultraviolet (voir planche 2).

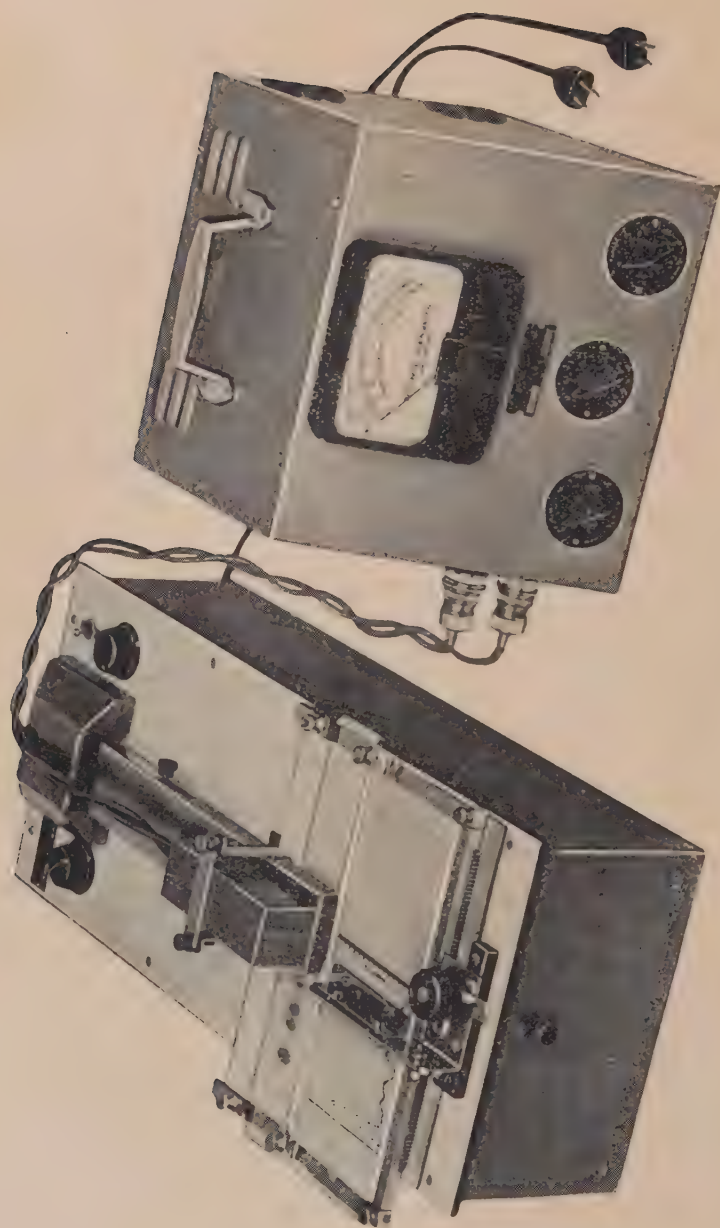
LECTURE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DIRECTE AVEC BOBINE DE CARTIER.

La bobine a été développée spécifiquement pour usage avec un spectrophotomètre de BECKMAN et ses proportions sont exactement calculées pour qu'elle puisse être substituée au porte-cuve à tirette normalement employé pour la lecture de la densité optique des liquides. Ainsi les dimensions extérieures du cadre sont $13,8 \times 10$ cm. La bobine est formée de deux parties principales. Un cadre en U dont les trois parties qui constituent la base et les parois latérales sont solidaires et sont traversées aux quatre coins par les vis qui la fixent en place dans le Spectrophotomètre de BECKMAN.

La deuxième partie est formée par une barre transversale sur laquelle sont attachées les parties amovibles, soit les deux bobines d'enroulement, un dispositif de repérage millimétré et un guide pour les bandes formé de deux plaques de matière plastique, articulé et munie d'une fente sur le trajet du faisceau lumineux.

Cette deuxième partie peut être désolidarisée du cadre en cours de lecture ou pour changer les bandes sans pour cela que le cadre ou la lampe du spectrophotomètre soit démonté. Pour la lecture des bandes elles-mêmes, on doit d'abord marquer la ligne de départ au crayon noir pour pouvoir la repérer ensuite, par son absorption singulière. Les bandes sont ensuite imprégnées d'huile de parafine et séchées entre des morceaux de papier-filtre, avant d'être enroulées sur la bobine. Pendant la lecture, le commutateur de sélection du spectrophotomètre doit être en position 0.1. pour obtenir la sensibilité nécessaire.

La lecture d'une bande en déroulement continu peut être



Densitomètre électronique (Paris-Labo, Modèle 525)

représentée graphiquement, l'absorption en ordonnées et la migration en millimètres, par l'abscisse (voir fig. 5). Nous avons constaté que la surface d'une telle courbe mesurée par planimétrie est en rapport direct avec la quantité de nucléotides présents sur le papier.

SERIE N° 15

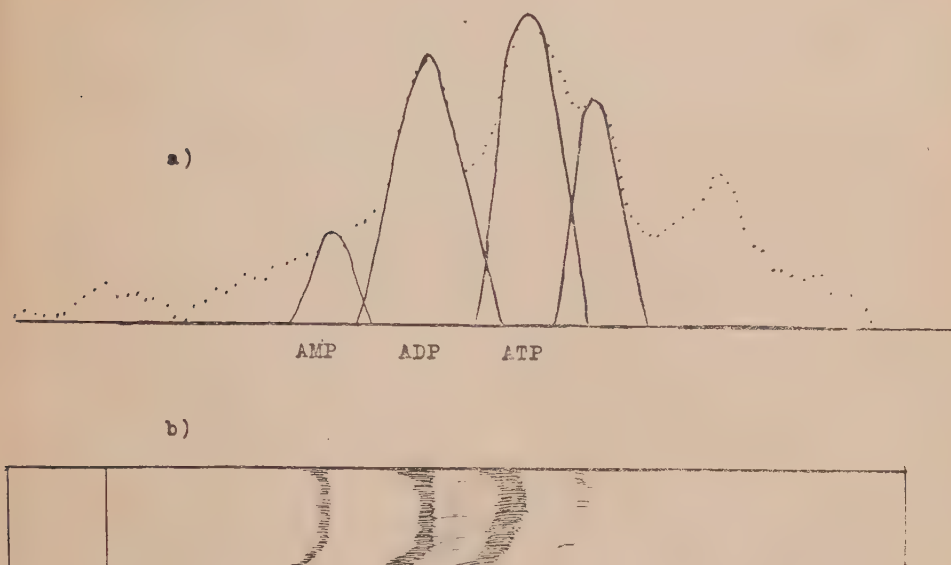


Fig. 5 — a) Courbe d'absorption en lumière U.V. (260 mμ)
de la bande (b)

b) Bande d'électrophorèse d'un extrait du cerveau
après 90' à 800 V. en tampon citrate pH 3,5,
telle qu'elle est vue en U.V.

Nous avons alors établi une courbe standard, ou abaque, en prenant des quantités progressivement croissantes d'un échantillon d'A.T.P. de pureté connue. Cette abaque pourra être utilisée ensuite pour la lecture directe en milligrammes de la quantité d'A.T.P. sur le papier après la simple mesure de la surface de sa courbe d'absorption.

ESTIMATION PAR RADIOACTIVITÉ.

Nous avons pu réaliser les mêmes courbes en substituant pour la densité optique la densité de radioactivité du P^{32} incor-

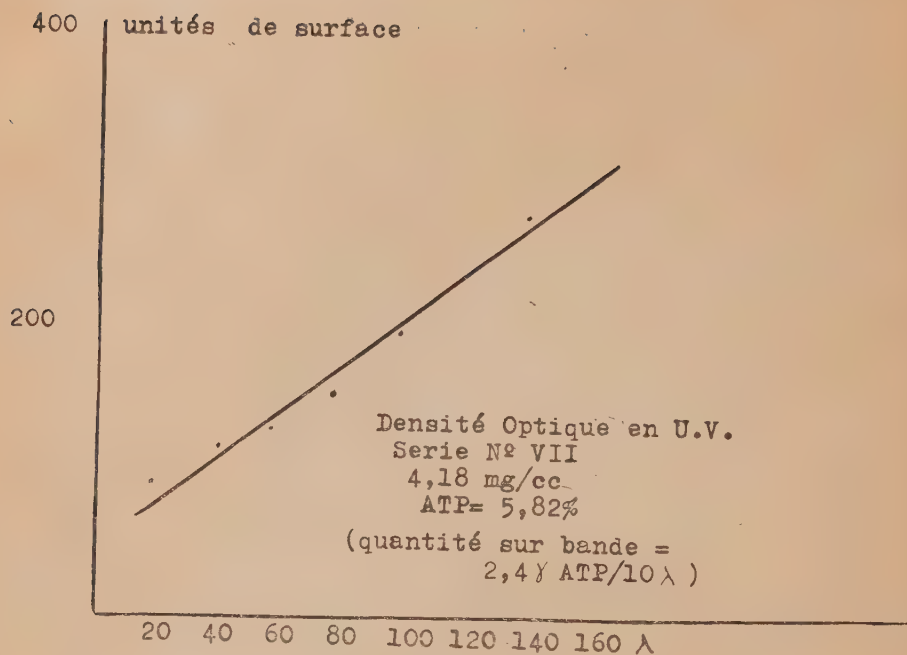


FIG. 7.

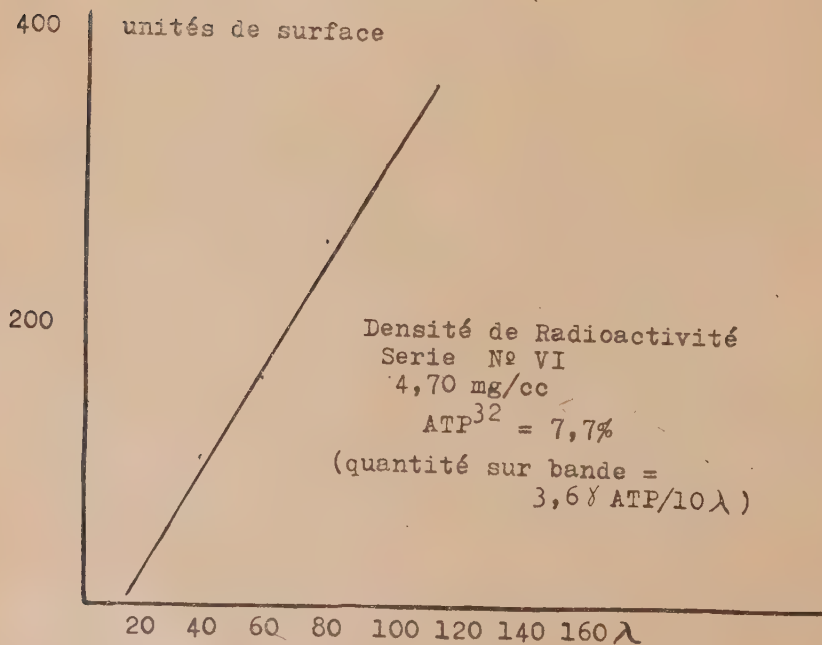


FIG. 8.

poré dans de l'A.T.P.³² et mesuré par déroulement continu de la bande électrophorétique devant un compteur Geiger-Muller équipé pour l'enregistrement graphique direct. L'A.T.P.³² est préparé à partir du muscle de lapin après injection préalable de P³². Nous sommes endettés envers notre ami le Professeur Agrégé Jacques PICARD, de la Faculté de Tours, pour l'A.T.P.³² employé.

La courbe de radioactivité ne montre aucune séparation de l'A.T.P. et ses dérivés mais la surface de cette courbe unique est en proportion directe avec la quantité réelle d'A.T.P. sur le papier comme témoin, la ligne droite obtenue en comparant les surfaces planimétriques des courbes de radioactivité aux poids d'A.T.P. sur les bandes (voir fig. 7).

RÉSULTATS.

Après la mise au point des techniques, nous avons effectué sept séries de bandes avec des quantités précises d'A.T.P. d'une pureté connue pour établir le rapport entre la surface de la courbe d'absorption optique et la quantité réelle mise sur la bande. Ainsi nous avons pu montrer qu'il existe un rapport direct entre ces deux facteurs, qui peut être exprimé graphiquement par une ligne droite (voir fig. 7 et 8).

CHAPITRE VII

RESULTATS

L'établissement d'une telle courbe devra permettre la lecture directe en unité de poids de l'A.T.P. + A.D.P., la part revenant à chacun étant facilement déduite par la relation entre leurs propres courbes.

Les résultats obtenus avec l'A.T.P. radioactif, sont semblables malgré qu'il n'y a pas séparation des deux courbes propres à l'A.T.P. et à l'A.D.P. La surface de la courbe représentant la densité de radioactivité résultant de ces deux produits en mélange donne une ligne droite, quand comparée à la quantité mise sur la bande.

Les résultats des analyses chimiques d'un certain nombre de séries représentatives sont figurés dans le tableau suivant.

Rapport A.T.P.-A.D.P. dans le tissu cérébral

Exp.	Surface en unité planimétrique		A.T.P.	P. hydroly- sable/ Gr. tissu
	A.T.P.	A.D.P.	A.D.P.	
15	86	90,5	1,05	72,9
16	67	84	1,25	43
17	56	70	1,25	63,2
18	66	68	1,03	29,6
19	54	52	0,965	52,8
20	60	72	1,20	22,4
21	64	72	1,12	127,9
22	65	69	1,06	21,8

Nos chiffres pour le P total et P organique, ainsi que pour l'adénine sont de même ordre de grandeur que ceux trouvés par d'autres auteurs tel KERR ; malgré que nos valeurs pour les phosphodérivés leur soient inférieures, ceci étant dû probablement à une hydrolyse partielle.

Nous avons trouvé une nette différence entre la teneur par gramme en phosphodérivés de haut potentiel dans le cerveau et dans le cervelet en faveur de ce dernier. Nous soumettons l'hypothèse que cette différence est due à ce qu'il y a davantage de matière grise par rapport au poids du tissu dans le cervelet que dans le cerveau lui-même. La surface des courbes d'absorption de l'A.T.P. et de l'A.D.P. est figurée ci-dessous, ainsi que leur rapport. Malgré la possibilité d'une certaine hydrolyse, il est intéressant de noter que le rapport est autour de l'unité.

Résultats des analyses chimiques d'un nombre représentatif d'expériences (mg/100 g de tissu frais).

Exp. n°	P total	P org.	PPO ₄	P hyd. 10 minutes
15	38,0	17,4	20,6	7,3
16	52,8	22,4	30,4	4,3
19	60,7	36,7	24,0	5,3
17	62,8	20,9	41,9	6,3
18	48,6	22,0	26,7	3,0
22			37,7	5,6
Moyenne ..	52,5	23,8	30,2	5,3

15	32,8	15,2	17,7	3,4
16	97,7	55,0	42,6	6,5
18	103,0	49,2	54,6	13,7
19	50,5	40,1	101,8	13,1
20	109,8	67,3	41,5	2,1
22	93,8	68,7	25,1	6,7
24	192,2	28,6	83,6	11,7
25	220,0	85,2	135,4	9,3
Moyenne ..	112,4	51,0	51,5	8,3

Nous avons aussi signalé la probabilité d'une teneur en lipides plus élevée dans le cerveau qui laisse un surnageant plus ou moins opalescent après extraction et centrifugation à vitesse moyenne. Dans ce travail, nous nous sommes efforcés d'établir une technique qui servira comme base pour de futures recherches qui auront comme but d'établir définitivement la teneur normale en adénine triphosphate et adénosine diphosphate et de suivre le rapport entre ces deux substances dans

les différentes conditions physiologiques ou pathologiques. Notamment dans la catatonie expérimentale [33] à la bulbo-capnine et chez les rats en état de « psychose » expérimentale, provoquée par diéthylamide de l'acide d-lysergique et d'autres composés analogues.

RESUME ET CONCLUSIONS

Les travaux biochimiques modernes ont montré l'importance des réactions de phosphorylation dans tous les processus métaboliques de la cellule vivante. Nous savons actuellement qu'aucune substance n'est utilisable par les tissus si elle ne subit pas à un stade quelconque de son métabolisme, le plus souvent au stade initial, une phosphorylation. En dernière analyse, ces phosphorylations ont pour conséquence de transformer l'énergie potentielle de la molécule alimentaire en une forme équivalente d'énergie chimique condensée, que l'activité enzymatique propre à chaque tissu peut instantanément transformer en énergie mécanique, électrique ou lumineuse. Cet accumulateur d'énergie est représenté par l'acide adénosine triphosphorique (A.T.P.), composé poly-phosphorylé à travers lequel passe toute l'énergie dissipée par les oxydations cellulaires.

C'est une notion aujourd'hui classique que l'activité du système nerveux est étroitement liée au métabolisme glucidique. La dégradation des glucides nécessite la présence d'A.T.P. dans le premier stade de leur dégradation, et cette glycolyse provoque ultérieurement la resynthèse de l'A.T.P. selon le schéma classique de MEYERHOF et de KREBS. L'activité métabolique, donc la capacité fonctionnelle du système nerveux, est étroitement liée à sa teneur en A.T.P. et en ses produits de déphosphorylation : l'acide adénosine di-phosphorique (A.D.P.) et l'acide adénosine mono-phosphorique (A.M.P.).

Dans le but de préciser ultérieurement le mécanisme d'action au niveau des centres nerveux d'agents hypnogènes et hallucinogènes, nous avons cherché à mettre au point une technique de dosage de ces phospho-dérivés de l'adénosine dans le cerveau et le cervelet, permettant de déterminer facilement la répartition du phosphore entre les trois formes : A.T.P., A.D.P. et A.M.P.

Cette recherche se heurte à une double difficulté :

— d'une part l'extrême labilité de ces phosphodérivés aussi bien *in vivo* (déphosphorylation enzymatique) qu'*in vitro* (instabilité chimique) ;

— d'autre part, la faible concentration tissulaire de ces substances.

Après un bref rappel du rôle biochimique joué par l'A.T.P. dans le métabolisme tissulaire, nous passons en revue dans la première partie de ce travail, les méthodes de dosage proposées et nous en discutons la valeur et l'application pratique. Cette étude critique fait ressortir :

— d'une part, la grande sensibilité de la mesure spectrophotométrique de l'absorption ultra-violette au maximum caractéristique (260 m μ) ;

— d'autre part, la nécessité de séparer les trois phosphodérivés de l'adénosine avant d'en effectuer isolément le dosage.

Parmi les techniques de séparation, la chromatographie sur papier ou sur résine échangeuse et l'électrophorèse représentent les méthodes de choix. Par sa rapidité d'exécution et par les conditions de pH peu acide ne risquant pas de provoquer une hydrolyse de l'acide phosphorique, l'électrophorèse sur papier représente la technique la mieux adaptée à son étude.

Dans un second chapitre, nous détaillons la technique du prélèvement du cerveau et du cervelet, technique qui doit réduire au minimum les chances de l'hydrolyse enzymatique de ces phosphodérivés. Le cerveau et le cervelet sont prélevés après congélation à l'air liquide et immédiatement extraits par l'acide trichloro-acétique. Nous précisons ensuite la technique de dosage et de séparation de ces phosphodérivés par électrophorèse sur papier.

La séparation électrophorétique est réalisée à un pH peu acide (pH 3,5 à 4,0), dans un tampon de faible force ionique ($\Gamma/2 = 0,02$) minimisant les risques d'hydrolyse par chauffage, et sous une différence de potentiel élevé (25 volts/cm). Dans ces conditions, une excellente séparation des trois nucléotides est obtenue en 60 à 90 minutes.

La proportion relative des trois fractions et éventuellement leur radioactivité (^{32}P) est déterminée :

— par enregistrement de l'absorption ultra-violette de la bande à l'aide d'un dispositif original développé par le Pr. CARTIER et pouvant être adapté au spectrophotomètre de BECKMAN ;

— par enregistrement de la radioactivité à l'aide d'un dispositif automatique adapté au compteur Geiger-Muller.

Une étude systématique de la technique proposée à partir d'extraits de muscles de rats a montré que la surface des courbes d'absorption ultra-violette est en relation linéaire avec la concentration en phosphonucléotides sur les bandes. Cette conclusion est confirmée par la mesure de la radioactivité.

Enfin, dans un troisième chapitre, nous appliquons cette technique à l'analyse de cerveau et de cervelet normaux et nous précisons la répartition de ses phosphodérivés de l'adénosine dans ces tissus. Cette étude montre dans le cervelet une teneur plus élevée en A.T.P. que dans le cerveau.

Le présent travail constitue un préambule à une étude biochimique des psychoses expérimentales, que nous nous proposons de poursuivre.

Vu :

LE DOYEN :

L. BINET.

Vu :

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

M. F. JAYLE.

Vu et permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS :

J. SARRAILH.

BIBLIOGRAPHIE

1. POLONOVSKI M. — Biochimie Médicale, Masson et Cie, 1952.
2. HILL T.L. et MORALES M.F. — *J. of Amer. Ch Soc.*, 73, 1.656, April 1951.
3. BALDWIN E. — Dynamic Aspects of Biochemistry, *Cambridge Univ. Press*, 1952.
4. Mc ILLWAINE H. — *Bioch. J.*, 1951, 50.
5. Mc ILLWAINE H., ANGUIANO G. et CHESHIRE J.D. — *Bioch. J.*, 1951, 50, 12.
6. Mc ILLWAINE H. et GORE M.B.R. — *Bioch. J.*, 1951, 57, 24.
7. HEALD P.J. — *Bioch. J.*, 1954, 57, 673.
8. KREPS E.M. — *Fiziol. Zhur. S.S.S.R.*, 1946, 32, 589 (cité par Palladine).
9. GAITONDE M.K. et RICHTER D. — *Proc. Roy. Soc. London*, 1955.
10. DAWSON R.M.C. et RICHTER D. — *Am. J. Physio.*, 160, 203-204, 1950.
11. FISKE et SUBARROW. — *J. Biol. Ch.*, 81, 629, 1929.
12. ALBAUM H. et LIPSHITZ. — *Arch. Bioch.*, 1950, v. 27, 102.
13. RUSKIN A.P. — Conférence pour le Prix de l'Evolution Psychiatrique. Hôpital Psych. St-Anne, 6 mars 1957.
14. OLSEN N.S. et KLEIN J.R. — *Research. Publs. Assoc. Research. Nervous and Mental Disease*, 1947, 26, 118.
15. DAWSON R.M.C. et RICHTER D. — *Am. J. Physio.*, 1950, 160, 11.
16. PALLADINE A.V. — III^e Congrès International de Biochimie, Bruxelles, août 1955.
17. Mc ELROY W.D. et GLASS R. — Phosphorus Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore, U.S.A., 1951, vol. 1.
18. CHARGAFF E. et DAVIDSON J.N. — The Nucleic Acids, vol. 1. The Academic Press, N.-Y., 1955.
19. LYTHGØE et TODD. — *Nature*, London, 155, 695, 1945.
20. COLOWICK S. et KAPLAN N. — Methodes in Enzymology, vol. III. The Academic Press, N.-Y., U.S.A., 1955.
21. HEALD P.J. — *Bioch. J.*, June 1956, vol. 63, 2.
22. TISELIUS A. — *Naturwiss.*, 37, 1950, 25.
23. ALEXANDER A.E. et JOHNSON P. — Colloid Science, vol. 1, Oxford, 1949.
24. SVENSSON H. — *Acta Chem. Scand.*, 4, 1950, 399, 1.329 ; 5, 1951, 72, 1.301, 1.410.
25. KUNKEL H. et TISELIUS A. — *J. Gen. Physiol.*, 35, 1951, 89.
26. LEDERER M. — Introduction to Paper Electrophoresis, Elsevier, Amsterdam, 1955.

27. CARTIER P. — Exposé Annuel de Bioch. Méd., 1954 (non publié).
28. WEILAND T. et FISCHER E. — *Naturwiss.*, 35, 1948, 29.
29. WALLENBERGER A. — *Nature*, 1954, 173, 205.
30. WADE et MORGAN. — *Bioch. J.*, 1954, 56, 41.
31. HANES C.S. et ISHERWOOD F.A. — *Nature*, 1949, 164, 1.107.
32. BURROWS S. et GRYLLS F.S.M. — *Exp. Cell. Res.* (suppl. 1),
pp. 338-349.
33. BARUK H. — *Précis de Psychiatrie*, Masson et Cie, Paris, 1950.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

L'énergie vitale du cerveau	9
-----------------------------------	---

PREMIÈRE PARTIE — NOTIONS CLASSIQUES

<i>Chapitre I.</i> — Méthodes classiques du dosage des phospho-dérivés de l'adénosine	17
<i>Chapitre II.</i> — Rappel de la structure et des propriétés physiques et chimiques des phospho-nucléotides	21

DEUXIÈME PARTIE — EXPERIENCES PERSONNELLES

<i>Chapitre I.</i> — Préparation du tissu cérébral par congélation à l'air liquide	25
<i>Chapitre II.</i> — Extraction et purification des nucléotides	27
<i>Chapitre III.</i> — L'analyse chimique	29
<i>Chapitre IV.</i> — Séparation par électrophorèse	32
<i>Chapitre V.</i> — Estimation par spectrophotométrie	38
RÉSULTATS	44
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	47

